

## **Estudo da metilação de ilhas CpG no gene da calpastatina, relacionado à maciez de carne em bovinos de corte: resultados preliminares**

Marina Ibelli Pereira Rocha<sup>1a</sup>; Suelen Scarpa de Mello<sup>1b</sup>; Vanessa Candiotti Buzatto<sup>2</sup>;  
Alexandre de Lima Oliveira<sup>1b</sup>; Flavia Aline Bressani<sup>3</sup>; Wilson Malagó-Jr<sup>3</sup>; Simone Cristina  
Méo Niciura<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aluno(a) de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, UFSCar, São Carlos, SP; <sup>a</sup>bolsista CNPq, <sup>b</sup>bolsista CAPES  
marinaibelli@hotmail.com

<sup>2</sup>Aluna de graduação em Ciências Biológicas, UFSCar, SP, bolsista CNPq/PIBIC

<sup>3</sup>Apoio técnico, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

<sup>4</sup>Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

A maciez da carne é influenciada pela intensidade da degradação de proteínas miofibrilares no período pós-mortem. A  $\mu$ -calpaína é a principal enzima responsável pelo amaciamento do músculo esquelético e, de maneira oposta, a calpastatina atua como inibidor endógeno das calpaínas e, portanto, diminui a extensão da proteólise. Sabe-se que a transcrição da maior parte dos genes é reprimida estavelmente na maioria dos tecidos e só permanece ativa nos seus tecidos de expressão, e que isso pode ser controlado por eventos epigenéticos. O termo epigenética refere-se às modificações químicas no DNA, que são herdadas de uma geração para outra, afetam a expressão gênica, mas não alteram o DNA, ou seja, alteram o fenótipo sem modificar o genótipo. As informações epigenéticas podem ser transmitidas por meio de modificações covalentes do DNA (metilação) ou das histonas, proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA em cromatina. A metilação do DNA, modificação relacionada ao silenciamento gênico, consiste na deposição de um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina (5-metil-citosina) localizada em posição 5' de um resíduo de guanina (dinucleotídeo CpG). Regiões ricas em dinucleotídeos CpG, chamadas de ilhas CpG, são encontradas em promotores e nos primeiros éxons de muitos genes. A principal técnica utilizada para a análise da metilação do DNA é o sequenciamento de DNA tratado com bissulfato de sódio, que permite a distinção entre 5-metil-citosina e citosina. O objetivo deste estudo foi identificar uma ilha CpG na região flanqueadora e nos primeiros éxons do gene da calpastatina (*CAST*; GeneID: 281039) e verificar o estado de metilação dessa ilha CpG em amostras de músculo, pele e fígado de fetos bovinos, por meio de sequenciamento de DNA tratado com bissulfato. Para a identificação das ilhas CpG, inicialmente buscou-se a sequência do gene *CAST* na base de dados do ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>), incluindo a região flanqueadora de 3.000 bp. A seguir analisou-se a presença de ilhas CpG com os programas Emboss (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>; com os parâmetros: tamanho > 200 pb, porcentagem de GC > 50% e conteúdo de GC observado/esperado > 0,6) e Methyl Primer Express (tamanho > 500 pb, porcentagem de GC > 55% e GC observado/esperado > 0,65). Foi identificada uma ilha CpG localizada de -252 a 157 pb no gene *CAST* para a qual foi desenhado um par de *primers* específico para o DNA tratado com bissulfato. Após amplificação por PCR, o fragmento de 412 pb obtido foi destinado ao sequenciamento capilar. Entretanto, a sequência gerada não apresentou os picos do eletroferograma bem definidos devido, provavelmente, à interferência de outros picos. Esses outros picos podem ter sido gerados pela presença de sequências diferentes após a PCR, devido à perda de complementaridade entre as fitas de DNA após o tratamento com bissulfato. Para solucionar essa dificuldade, será necessário realizar a clonagem do fragmento antes do sequenciamento.

**Apoio financeiro:** CNPq (processo 132949/2011-3) e FAPESP (processo 2008/03916-8).

**Área:** Biotecnologia